

02 P 06756

BC

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Mai 2002 (30.05.2002)

PCT

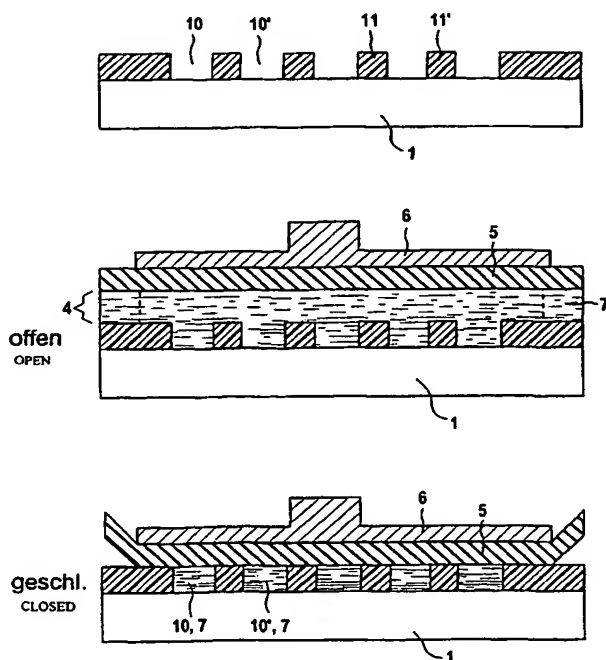
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/41992 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE01/04437**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
26. November 2001 (26.11.2001)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
100 58 394.6 24. November 2000 (24.11.2000) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MUND, Konrad**
[DE/DE]; Langenbrucker Weg 10, 91080 Uttenreuth (DE).
GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, 91074
Herzogenaurach (DE). **STANZEL, Manfred** [DE/DE];
Taunusstr. 100, 91056 Erlangen (DE). **HINTSCHE,**
Rainer [DE/DE]; Gravensteinerstr.61 C, 13127 Berlin
(DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGE-**
SELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **CA, JP, US.**
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **METHOD FOR BIOCHEMICAL ANALYSIS AND CORRESPONDING ARRANGEMENT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN FÜR DIE BIOCHEMISCHE ANALYTIK UND ZUGEHÖRIGE ANORDNUNG**



(57) Abstract: The invention relates to a method for biochemical analysis using a micro-reaction array with at least two reaction chambers for materials which react together chemically or biochemically. According to the invention, the reaction chambers are smaller than 1 μ l, said reaction chambers are filled together by throughflow, the chemical or biochemical reactions of the substances retained therein then occurs in the individual isolated reaction chambers, thus preventing an interference between the reactions in the individual reaction chambers and the reaction products remain enclosed in the relevant reaction chambers. According to the invention, in said arrangement the planar array has at least two reaction chambers for substances, whereby means are provided for closing the reaction chambers with the goal of preventing an exchange of substances.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren für die biochemische Analytik wird ein Mikroreaktionsarray mit mindestens zwei Reaktionsräumen zur Aufnahme von Stoffen, die miteinander chemisch bzw. biochemisch reagieren, verwendet. Gemäß der Erfindung sind die Reaktionsräume kleiner als 1 μ m, werden die Reaktionsräume gemeinsam im Durchfluss befüllt, erfolgen anschließend in den einzelnen voneinander getrennten Reaktionsräumen die chemischen bzw. biochemischen Reaktionen der dort eingeschlossenen Substanzen, wobei ein Übersprechen von Reaktionen zwischen den einzelnen Reaktions-

räumen ausgeschlossen ist, und bleiben die Reaktionsprodukte in den jeweiligen Reaktionskammern eingeschlossen. Bei der zugehörigen Anordnung hat das planare Array wenigstens zwei Reaktionsräume zur Aufnahme von Stoffen, wobei Mittel zum Schließen der Reaktionsräume zum Zwecke des Verhindern eines Stoffaustausches vorhanden sind.

WO 02/41992 A2

**Erklärungen gemäß Regel 4.17:**

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten CA, JP, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Beschreibung

Verfahren für die biochemische Analytik und zugehörige
Anordnung

5

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren für die biochemische Analytik, unter Verwendung eines Mikroreaktionsarrays mit mindestens zwei Reaktionsräumen zur Aufnahme von Stoffen, die mit anderen Substanzen chemisch bzw. biochemisch reagieren. Daneben bezieht sich die Erfindung auch auf eine Anordnung zur Durchführung des Verfahrens.

Zur Entwicklung neuer Wirkstoffe in der Life Science Industrie (Pharmaka), Lebensmittel-Technologie, Agrar-Technik (Pflanzenschutz), in der medizinischen Diagnostik, aber auch zur Lösung von verschiedensten Aufgaben in der allgemeinen Biotechnologie, werden heute in zunehmendem Maße Methoden der kombinatorischen Analyse bzw. Synthese angewandt. Dazu werden z.B. sog. Mikro-Titerplatten-Techniken mit Reaktionswannen in Arraystruktur verwendet, die zur gleichzeitigen Reaktion auf einer Arrayfläche von beispielsweise ca. $12 \times 8 \text{ cm}^2$ entweder 96 oder sogar 384 Wannen einsetzen. Die Dichte dieser Arrays wird in Zukunft weiter steigen, was bedeutet, dass verschiedenartige chemische Reaktionen in immer dichter angeordneten Reaktionsräumen stattfinden müssen.

Extrem ist die Situation z.B. bei einem Array von verschiedenen DNA-Fängermolekülen, die in einem Abstand von nur einigen zehn Mikrometern und einer Dichte von z.B. einigen hundert Positionen pro wenigen mm^2 auf einem ebenen Substrat angeordnet sind, dem sog. DNA-Chip. Sind beim analytischen Nachweis von z.B. unbekannter DNA frei bewegliche Moleküle beteiligt, kommt es bei solch dichten Arrays zu chemischem Übersprechen.

35

Aus einer Reihe von Gründen, z.B. wegen der hohen Spezifität und der niedrigen Nachweisgrenze, bedient man sich bei der

biochemischen Analytik häufig enzymgekoppelter Nachweisverfahren. Weit verbreitet sind z.B. in der medizinischen Diagnostik und im Forschungsbereich sog. ELISA(Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay)-Tests. (Literatur s.h. B. Alberts et al. (eds.), Molekularbiologie der Zelle (1997), 3. Aufl., Seite 216, VCH Weinheim) Auch für Anwendungen auf dem Gebiet des DNA-Chips werden Verfahren mit Enzymmarkern bei einer bekannten Methode des Redox-(Re)cyclings eingesetzt (A.v.d.Berg, P. Bergveld (eds.) Proceedings of the pTAS '94 Workshop (1994), Seiten 249 bis 254, Kluwer Academic Publishers Dordrecht).

In allen in der Fachliteratur erwähnten Fällen liegt das Enzym nicht frei in der flüssigen Phase der als sog. Assays bezeichneten Anordnung vor, sondern ist gebunden und markiert so als „Enzym-Label“ die primär nachzuweisende Substanz. Dabei erfolgt die „Bindung“ der Enzymmoleküle an die nachzuweisende Substanz stets stöchiometrisch. Zur Amplifikation, d.h. Verstärkung, kommt es, indem das Enzym zugesetzte Substratmoleküle mit hoher Geschwindigkeit umsetzt. Dieser Umsatz wird, je nach verwendetem Substrat bzw. entstehendem Produkt, beispielsweise optisch oder elektrochemisch quantifiziert. Hierfür wird - unabhängig vom eingesetzten Verfahren - insbesondere die Konzentrationszunahme des Produktes P, d.h. die zeitabhängige Funktion $dc(P)/dt$, verfolgt.

Werden solche Assays in einem Array, wie beim Stand der Technik im Einzelnen beschrieben ist, durchgeführt, können vom Enzym gebildete, frei bewegliche Reaktionsprodukte auch benachbarte enzymfreie Arraypositionen erreichen und dort die Gegenwart der Enzym-Label vortäuschen. Man spricht vom Übersprechen, was zu Messfehlern führt und somit falsche Ergebnisse liefern kann.

Davon ausgehend ist es Aufgabe der Erfindung, Verfahren und zugehörige Anordnungen anzugeben, mit denen gegenüber dem Stand der Technik eine erhöhte Verlässlichkeit durch Vermei-

dung von Übersprechen und damit Ausschluss von „falsch positiven“ Resultaten sichergestellt ist. Mit einer erhöhte Genauigkeit sollen Verbesserungen insbesondere in der Effektivität der Messungen erreicht werden.

5

Die Aufgabe ist erfindungsgemäß bei einem Verfahren der eingangs genannten Art durch die Maßnahmen des Patentanspruches 1 gelöst. Weiterbildungen sind in den abhängigen Verfahrens-
ansprüchen angegeben. Eine zugehörige Anordnung ist Gegen-
stand des Patentanspruches 14. Diesbezügliche Weiterbildungen
sind in den abhängigen Sachansprüchen angegeben.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren werden lokal abgegrenzte Reaktionsräume als erstes Volumen verwendet, wobei die Reak-
tionsräume über ein zweites Volumen, dem sog. Versorgungsvolumen, miteinander verbunden werden können und in den einzelnen Reaktionsräumen quantitativ und/oder spezies-differente chemische bzw. biochemische Reaktionen ablaufen. Unter
spezies-differente Reaktionen werden qualitativ unterschiedliche bzw. qualitativ differente Prozesse verstanden. Dabei
wird gleichermaßen der Stoffaustausch zwischen Reaktionsräumen und dem Versorgungsvolumen je nach Bedarf in einer oder beiden Richtungen zugelassen oder verhindert.

Wesentlicher Vorteil der Erfindung ist, dass trotz der eng benachbarten Reaktionsräume nunmehr ein störendes Übersprechen, das die Messergebnisse verfälschen kann, unmöglich gemacht wird und somit die Selektivität verbessert wird. Außerdem wird durch die Erfindung auch die Nachweisempfindlichkeit erhöht, d.h. die Nachweisgrenze wird zu geringeren Mengen verschoben.

Zur praktischen Realisierung der Nachweisempfindlichkeits-Erhöhung ist es sinnvoll, die zeitliche Änderung der Substrat/Produktkonzentration möglichst zu steigern. Dies wird
beim erfindungsgemäßen Verfahren durch eine gezielte Verringerung des Reaktionsvolumens auf deutlich kleiner 1 µm,

insbesondere im Bereich von einem Nanoliter(1nl), und einer damit verbundenen Steigerung der Substrat-Produktkonzentrations-Änderungen erreicht.

- 5 Bei den erfindungsgemäßen Anordnungen handelt es sich jeweils um Arrays von mehr als zwei, typisch aber mit einigen hundert
10 Positionen auf wenigen Quadratmillimetern, vorzugsweise 1 bis ca. 10 mm², die auf einem planaren Substrat angeordnet sind. Das jeweilige Array ist als Reaktionsräume- bzw. Reaktions-
15 kammer-Array ausgeführt und ist vorteilhafterweise Bestandteil eines Behältnisses mit einem für die Reaktionsräume gemeinsam zugänglichen Versorgungsvolumen. Ein solches Versorgungsvolumen kann z.B. durch Einbettung des Reaktionskammer-
Arrays in einer Durchflusszelle, über die das gesamte Fluid-
15 handling der für die Nachweis- oder Synthese-Reaktion notwendigen chemischen/biochemischen Stoffe abgewickelt werden kann, realisiert werden.

- Mittels einer in der Durchflusszelle dem planaren Substrat
20 gegenüberliegenden elastischen Membran oder Schicht, die z.B. aus Silikongummi bestehen kann, werden bei einer ersten vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung durch Anpressen einer mechanischen Vorrichtung an das Substrat die durch die
einzelnen Arraypositionen gebildeten Reaktionsräume vonein-
25 ander getrennt, so dass ein Übersprechen wirksam verhindert wird. Eine solche Vorrichtung kann z.B. in Form eines Deckels, eines Stempels oder einer dichtenden Membran ausgebildet sein, mit denen die von den Reaktionsräumen gebildeten Kavitäten verschlossen werden. Mit dem Verschließen der
30 Kavitäten findet auch eine Volumenverringerung der Flüssigkeitsräume über den einzelnen Arraypositionen statt, so dass die durch die chemischen/biochemischen Reaktionen ausgelöste Konzentrationsänderung von Substrat/Produkt erhöht wird. Damit wird also vorteilhafterweise ebenfalls die Nachweis-
35 empfindlichkeit gesteigert.

Gleiches kann durch Überschichtung mit einer Sperrflüssigkeit bei einer anderen vorzugsweisen Ausführungsform der Erfindung erreicht werden. Sobald eine geeignete Sperrflüssigkeit, die nicht mischbar mit der Flüssigkeit in den Reaktionskavitäten ist, den Durchflusskanal erfüllt, führt dies zu den gleichen Effekten wie das Verschließen der Arraykavitäten mittels eines Silikonstempels. Die Sperrflüssigkeit ist dabei z.B. Silikonöl. In einer vorteilhaften Variante dieser Ausführungsform werden die Reaktionsräume mit Hydrogel gefüllt, um so den wasserhaltigen Reaktionsräumen mechanische Stabilität zu verleihen, wenn die Sperrflüssigkeit in den Durchflusskanal eintritt. Als Hydrogel kann z.B. Polyacrylamid verwendet werden, das gegenüber Silikonöl die geforderten Eigenschaften aufweist.

In einer eigenerfinderischen Weiterbildung des beanspruchten Verfahrens kann auch ein unterschiedliches chemisches Löslichkeitsverhalten der beteiligten Stoffe und Substanzen ausgenutzt werden. Auch bei dieser Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung werden die Reaktionsräume vorteilhaft mit einem Hydrogel gefüllt. Ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten zwischen Hydrogel-Reaktionsraum und einer geeigneten flüssigen Phase im Durchflusskanal des Versorgungsvolumens sorgt dann dafür, dass Reaktions-Edukte aus der flüssigen Phase in die Hydrogelphase eintreten, Reaktionsprodukte die Hydrogelphase jedoch nicht mehr verlassen können. Ein solches Reaktions-Edukt ist z.B. das Enzymsubstrat.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen jeweils in schematischer Darstellung

Figur 1 einen Messaufbau nach dem Stand der Technik, aus der das Messverfahren einerseits und das störende Übersprechen andererseits ersichtlich ist,

Figur 2 in drei Teilschritten eine beispielhafte Anordnung zum mechanischen Verschließen von Kavitäten,

Figur 3 in drei Teilschritten eine entsprechende Anordnung zum Verschließen der Kavitäten mittels Sperrmedien und

Figur 4 in drei Teilschritten eine dritte Anordnung, bei der das Verschließen der Kavitäten durch unterschiedliches Löslichkeitsverhalten der beteiligten Medien erreicht wird.

In den Figuren haben gleiche bzw. gleichwirkende Teile gleiche bzw. sich entsprechende Bezugszeichen. Die Figuren werden nachfolgend teilweise gemeinsam beschrieben.

In Figur 1 ist mit 1 ein Substrat mit planarer Oberfläche bezeichnet, das beispielsweise durch die kristallographische Oberfläche eines Silizium-Chips gebildet ist. Auf dem Substrat 1 ist ein Array von optischen/elektrischen Detektoren 2, 2', ... auf Arraypositionen 8, 8', ... realisiert, mit denen bioanalytische Untersuchungen mit sog. enzymgekoppelten Reaktionen vorgenommen werden, wozu Fängermoleküle einerseits und Analytmoleküle andererseits verwendet werden. Auf den Arraypositionen 8, 8', ... befinden sich unterschiedliche Fängermoleküle 110, 120, ..., so dass auf jeder spezifischen Arrayposition unterschiedliche Analytmoleküle nachgewiesen werden können.

Im Einzelnen ist in Figur 1 bei einem Verfahren für bioanalytischen Untersuchungen ein erstes Fänger-Molekül mit 110 auf der Arrayposition 8 und ein zweites Fängermolekül 120 auf der Arrayposition 8', ein Analyt-Molekül mit 200 und ein sog. Enzym-Label mit 300 bezeichnet. Dabei reagiert beispielsweise das Fängermolekül 110 spezifisch mit einem komplementären Analytmolekül 200 und immobilisiert so im Array positions-spezifisch einen Enzym-Label 300. Ein anschließend als Edukt zugegebenes Enzym-Substrat 400 wird durch die katalytische Wirkung des Enzym-Labels 300 in ein Produkt 500 überführt.

- Das Analyt-Molekül 200 kann in Figur 1 also nur mit dem Fängermolekül 110, nicht aber mit dem Fängermolekül 120 reagieren. Auf jeder Arrayposition 8, 8', ... des Wafers 1
- 5 kann mit Hilfe des dort lokalisierten optischen oder elektrischen Detektors 2, 2', ... die Abnahme/Zunahme von Substrat/Produkt gemessen werden. Speziell elektrische Detektoren haben Vorteile der Messtechnik.
- 10 Entsprechend dem Stand der Technik ist man bemüht, die Arraypositionen 8, 8', ... und deren Abstände möglichst klein auszubilden. Problematisch ist beim Stand der Technik, dass ein sog. chemisches Übersprechen zwischen den einzelnen
- 15 Positionen 8, 8', ... auftreten kann. Dies bedeutet, dass entweder Enzym-Substrat 400, das vorstehend als Edukt definiert wurde, oder das Reaktionsprodukt 500 von einer ersten Arrayposition 8 auf eine zweite Arrayposition 8' gelangen kann. Falls eine Nachbarposition erreicht ist, wird ein falsches Signal erzeugt, das ein positives Ergebnis vor-
- 20 täuscht. In der Praxis spricht man auch von einem „falsch positiven“ Signal.

In den Figuren 2 bis 4 sind für unterschiedliche Alternativen einzelne Reaktionsräume 10, 10', ... mit einem Einzolvolumen

25 von jeweils kleiner 1µl in einer Arraykonfiguration angeordnet. Die Reaktionsräume 10, 10', ... sind dabei betriebsmäßig voneinander getrennt.

- In Figur 2 ist in drei Teilschritten das Betätigen einer
- 30 Anordnung verdeutlicht, bei der Reaktionsräume 10, 10', ... durch Wände 11, 11', ... getrennt sind. Die Wände 11, 11' können in einer besonderen geometrischen Ausführungsform durch photostrukturierte, kreisförmige Polymerringe von z.B. 150 µm innerem Durchmesser, 180 µm äußerem Durchmesser sowie
- 35 50 µm Höhe realisiert werden. Die Reaktionsräume 10, 10', ... sind beispielsweise mit in einem Elektrolyten 7 gelösten Reaktions-Edukt, z.B. einem Enzym-Substrat, befüllt, wobei

der Elektrolyt 2 über ein Versorgungsvolumen 4 den einzelnen Reaktionsräumen zugeführt wird.

- Die Reaktionsräume 10, 10', ... können in Figur 2 durch ein Gehäuseoberteil 5 mittels eines mechanischen Stempels 6 abgeschlossen werden. Im offenen Zustand befindet sich über den Kavitäten ein Versorgungsvolumen 4 mit einem flüssigen Elektrolyten. In Figur 2 werden zuerst die Reaktionsräume 10, 10', ... als bei entferntem Gehäuseoberteil 5 offene Kammern im Durchfluss mit dem Elektrolyten/Edukt 7 befüllt, wobei das Reservoir für den Elektrolyten 7 hier nicht im Einzelnen dargestellt ist. Nach Befüllung der Reaktionskavitäten 10, 10', ... mit Elektrolyt/Edukt 7 wird mittels des Stempels 6 das Gehäuseoberteil 5, das z.B. aus einer Silikonmembran bestehen kann, auf die Wandungen 11, 11', ..., die wie bereits erwähnt aus Polyimid bestehen, aufgesetzt. Damit werden die Reaktionsräume 10, 10', ... abgeschlossen, so dass anschließend ein Stoffaustausch verhindert wird.
- In Figur 3 ist der untere Bereich ähnlich Figur 2 aufgebaut. Die Wände 11, 11', ... können in einer besonderen Ausführungsform, was in der zeichnerischen Wiedergabe der Figur 3 nicht ersichtlich ist, speziell durch photostrukturierte, kreisförmige Polymerringe mit innerem Durchmesser d ($d=2r$) von z.B. $d=150\text{ }\mu\text{m}$, äußerem Durchmesser D von z.B. $D=180\text{ }\mu\text{m}$ einer Höhe h von z.B. $h=5\text{ }\mu\text{m}$ realisiert sein. Die aus solchen Abmessungen resultierenden Reaktionskavitäten mit einem Füllvolumen von etwa $0,1\text{ nl}$ ($r^2\pi h = (75\text{ }\mu\text{m})^2 \cdot 3.14 \cdot 5\text{ }\mu\text{m}$) werden in dieser besonderen Ausführungsform mit einem Hydrogel 3 hoher Wasseraufnahmefähigkeit, z.B. Polyacrylamid, gefüllt. Im Hydrogel 3 kann dann eine Fänger-DNA für einen spezifischen DNA-Nachweis immobilisiert eingebracht werden.

- Zur Realisierung des Assays werden die Reaktionsräume 10, 10', ... wiederum über das gemeinsame Versorgungsvolumen 4 mit Puffer, Reagenzien und schließlich Enzymsubstrat versorgt. Nachdem das Hydrogel 3 eines jeden Reaktionsraumes 10,

10' mit Enzym-substrathaltigem Puffer ins Gleichgewicht gebracht wurde und der enzymatische Umsatz begonnen hat, wird das Versorgungsvolumen 4 mit einer Sperrflüssigkeit, z.B. Silikonöl, geflutet. Dies bewirkt, dass die Flüssigkeit über
5 den Reaktionsräumen durch Silikonöl verdrängt wird. Die Hydrogelstruktur sorgt für die mechanische Stabilität der Reaktionsräume. Aufgrund der Unlöslichkeit von Enzymprodukt in Silikonöl wird Diffusion desselben aus dem Hydrogel heraus, hin zu Nachbarreaktionsräumen verhindert. Das Reaktions-
10 produkt kann sich so in den Reaktionsräumen stark anreichern ohne die Nachbarreaktionsräume zu erreichen. Es ist also eine gleichermaßen hohe Empfindlichkeit und hohe Selektivität vorhanden.

15 Wesentlich ist bei beiden Ausführungsbeispielen gemäß Figur 2 und 3, dass die einzelnen Reaktionskavitäten 10, 10', ... zuerst mit dem Elektrolyten 7 im Durchlauf aus dem Versorgungsvolumen 4 befüllt werden und dann ein Material, beispielsweise ein Silikonöl 9, das mit dem Elektrolyten 7 Phasengrenzen bildet, aufgebracht wird. Durch die Phasengrenze
20 wird erreicht, dass nunmehr ein Stoffaustausch nicht mehr möglich ist und störende Verfälschungen ausgeschlossen werden.

25 In der spezifischen Variante der Ausführungsform gemäß Figur 3 werden die Reaktionsräume 10, 10', ... mit Hydrogel 3, z.B. Polyacrylamid, gefüllt, um so den wasserhaltigen Reaktionsräumen 10, 10', ... mechanische Stabilität zu verleihen, wenn die Sperrflüssigkeit 9, z.B. Silikonöl, in den Durchfluss-
30 kanal eintritt.

Figur 4 entspricht vom Aufbau wiederum im Wesentlichen Figur 2. Die Reaktionsräume 10, 10', ... werden entsprechend Figur 2 und Figur 3 im Durchlauf aus dem Versorgungsvolumen 4 be-
35 füllt. In diesem Fall haben aber die Reaktions-Edukte, die hier mit E bezeichnet sind, das Vermögen, durch ihr spezifisches Löslichkeitsverhalten in den nach Befüllung in den

Reaktionsräumen 10, 10', ... befindlichen Elektrolyten 7 einzudringen.

Bei der Anordnung gemäß Figur 4 läuft die Reaktion in den Reaktionskammern dann wie bereits vorstehend beschrieben ab. Durch das spezifische Löslichkeitsverhalten des entstehenden Reaktionsproduktes, das hier mit P bezeichnet ist, ist bei der Reaktion allerdings ein Stoffaustritt von P nicht möglich. Es wird also somit ebenfalls das störende Übersprechen verhindert. Auch in dieser Ausführungsform werden entsprechend Figur 3 die Reaktionsräume vorteilhaft mit einem Hydrogel 3 gefüllt.

Das beschriebene Verfahren und die zugehörigen Anordnungen können insbesondere erfolgreich in der medizinischen Diagnostik und der Biotechnologie eingesetzt werden. Durch den nunmehr erreichten Ausschluss des Übersprechens als wesentliche Fehlerquelle lassen sich damit genauere Ergebnisse als bisher erzielen.

Patentansprüche

1. Verfahren für die biochemische Analytik, unter Verwendung eines Mikroreaktionsarrays mit mindestens zwei Reaktions-
5 räumen zur Aufnahme von Stoffen, die miteinander chemisch bzw. biochemisch reagieren, mit folgenden Maßnahmen:
- es werden lokal abgegrenzte Reaktionsräume als erstes Volumen verwendet,
 - die Reaktionsräume sind über ein zweites Volumen, dem sog.
10 Versorgungsvolumen, miteinander verbunden,
 - in den einzelnen Reaktionsräumen laufen quantitativ und/oder spezie-s-differente chemische bzw. biochemische Reaktionen ab,
 - der Stoffaustausch zwischen Reaktionsräumen und dem Ver-
15 sorgungsvolumen wird je nach Bedarf in einer oder beiden Richtungen zugelassen oder verhindert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , dass zu einem ersten Zeitpunkt (t_1) ein
20 definierter Stoffaustausch zwischen den Reaktionsräumen und dem Versorgungsvolumen erfolgt und zu einem zweiten Zeitpunkt (t_2) der Stoffaustausch zwischen den Reaktionsräumen weitestgehend unterdrückt oder verhindert wird. (FIG 2, 3)
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , dass durch unterschiedliches Löslichkeitsverhalten von chemischen Substanzen in verschiedenen Flüssigkeiten in den Reaktionsräumen und dem Versorgungsvolumen der Stoffaustausch in einer Richtung selektiv ver-
30 hindert wird. (FIG 4)
4. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , dass zum Zweck des definierten Stoffaustausches die Reaktionsräume mechanisch geöffnet und ver-
35 schlossen werden. (FIG 2)

5. Verfahren nach Anspruch 4, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , dass das Verschließen der Reaktionsräume
durch Verdrängen des Versorgungsvolumens realisiert wird.
- 5 6. Verfahren nach Anspruch 2, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t , dass zum Zweck des zeitlich definierten
Stoffaustausches die Phasengrenzen zwischen den in den Reak-
tionsräumen und dem Versorgungsvolumen befindlichen Stoffen
zeitweise durchlässig gemacht werden. (FIG 3)
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 5, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass das Verschließen der Phasen-
grenzen durch Verdrängen des Versorgungsvolumens durch ein
Sperr-Medium realisiert wird.
- 15 8. Verfahren nach Anspruch 7, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass die Flüssigkeit im Versor-
gungsvolumen durch ein Gas, beispielsweise Luft, oder durch
eine nicht mischbare Flüssigkeit, beispielsweise Silikonöl,
20 verdrängt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 3, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass aufgrund von unterschied-
lichem Lösungsverhalten der Reaktionspartner die Phasen-
25 grenzen zwischen den in den Reaktionsräumen und dem Versor-
gungsvolumen befindlichen Stoffen undurchlässig werden.
10. Verfahren nach Anspruch 3, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass Edukte einer chemischen
30 Reaktion, die in einer Hydrogelschicht abläuft, aus dem
Versorgungsvolumen in die Hydrogelschicht eindiffundieren,
aber mindestens ein Produkt der chemischen Reaktion nicht aus
der Hydrogelschicht herausdiffundiert.
- 35 11. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass in den einzelnen, von-

einander getrennten Reaktionsräumen eine kombinatorische Analyse und/oder Synthese der Substanzen erfolgt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
5 g e k e n n z e i c h n e t durch die Anwendung beim Redoxrecycling.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
g e k e n n z e i c h n e t durch die Anwendung bei enzym-
10 gekoppelten Reaktionen.

14. Anordnung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1
oder einem der Ansprüche 2 bis 13, unter Verwendung eines
planaren Arrays, d a d u r c h g e k e n n z e i c h -
15 n e t , dass das planare Array (8, 8', ...) wenigstens zwei
Reaktionsräume (10, 10', ...) zur Aufnahme von Stoffen aus
einem Versorgungsvolumen (4) aufweist, wobei Mittel zum
Schließen der Reaktionsräume (10, 10', ...) vorhanden sind.

15. Anordnung nach Anspruch 14, d a d u r c h g e -
20 k e n n z e i c h n e t , dass die Reaktionsräume (10, 10',
...) jeweils ein Volumen von weniger als 1 µl aufweisen.

16. Anordnung nach Anspruch 14, d a d u r c h g e -
25 k e n n z e i c h n e t , dass das planare Array (8, 8',
...) auf einem Silizium-Substrat (1) aufgebracht ist.

17. Anordnung nach Anspruch 16, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass die Reaktionsräume (10, 10',
30 ...) durch eine auf Silizium aufgebrachte Polymerschicht (11)
voneinander getrennt sind.

18. Anordnung nach Anspruch 16, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass die Reaktionsräume (10, 10',
35 ...) in das Silizium-Substrat durch Mikrostrukturtechnik
eingebracht sind.

19. Anordnung nach Anspruch 4, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass die Reaktionsräume (10, 10',
...) flüssigkeitsgefüllte Hohlräume sind, die zum Zwecke des
Stoffaustausches offen sind, so dass sie in Kontakt mit einem
5 Versorgungsvolumen (4) stehen und somit gleichzeitig füllbar
sind.
20. Anordnung nach Anspruch 14, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass der Stoffaustausch der
10 flüssigkeitsgefüllten Reaktionshohlräume (10, 10', ...) mit
dem Versorgungsvolumen (4) durch Verschließen unterbunden
wird, wobei kein weiteres Medium, wie etwa Luft, an die
Hohlräume (10, 10', ...) gelangen kann.
21. Anordnung nach Anspruch 14, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass für das Verschließen der
Reaktionsräume (10, 10', ...) eine Verschlusschicht vor-
handen ist.
22. Anordnung nach Anspruch 21, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass der Verschluss durch eine
20 planare, partiell elastische Polymerschicht (5), wie z.B.
Silicongummi, realisiert ist.
23. Anordnung nach Anspruch 22, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass das Verschließen der Öffnung
der Reaktionsräume (10, 10', ...) durch Verdrängen des Ver-
sorgungsvolumens (4) erfolgt.
24. Anordnung nach Anspruch 23, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass zum Verdrängen des Ver-
sorgungsvolumens (4) Gas, beispielsweise Luft, oder eine nicht
30 mischbare Flüssigkeit (9) vorhanden ist.
25. Anordnung nach einem der Ansprüche 14 bis 24, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass die Reak-
tionsräume (10, 10', ...) durch gelgefüllte Hohlräume (3),
35

die zum Zwecke des Stoffaustausches eine Phasengrenze Gel/
Versorgungsvolumen besitzen, realisiert sind.

26. Anordnung nach Anspruch 25, d a d u r c h g e -
5 k e n n z e i c h n e t , dass durch Verschließen der
Phasengrenze der Stoffaustausch der gelgefüllten Reaktions-
räume (10, 10', ...) unterbindbar ist.

1/4

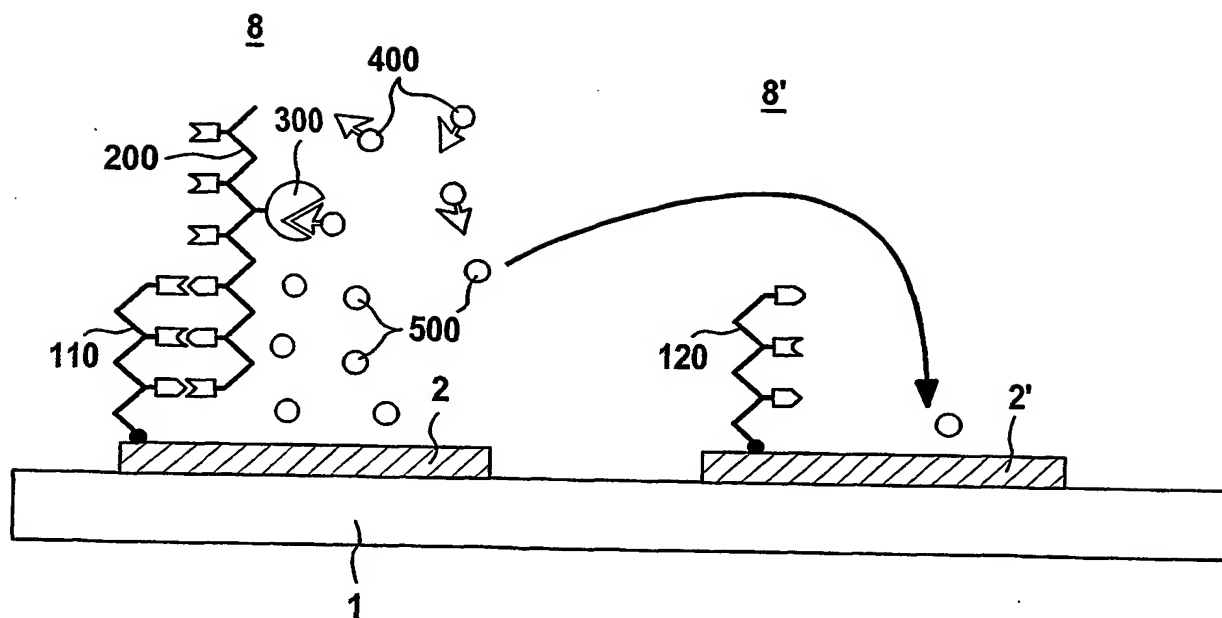


FIG 1

2/4

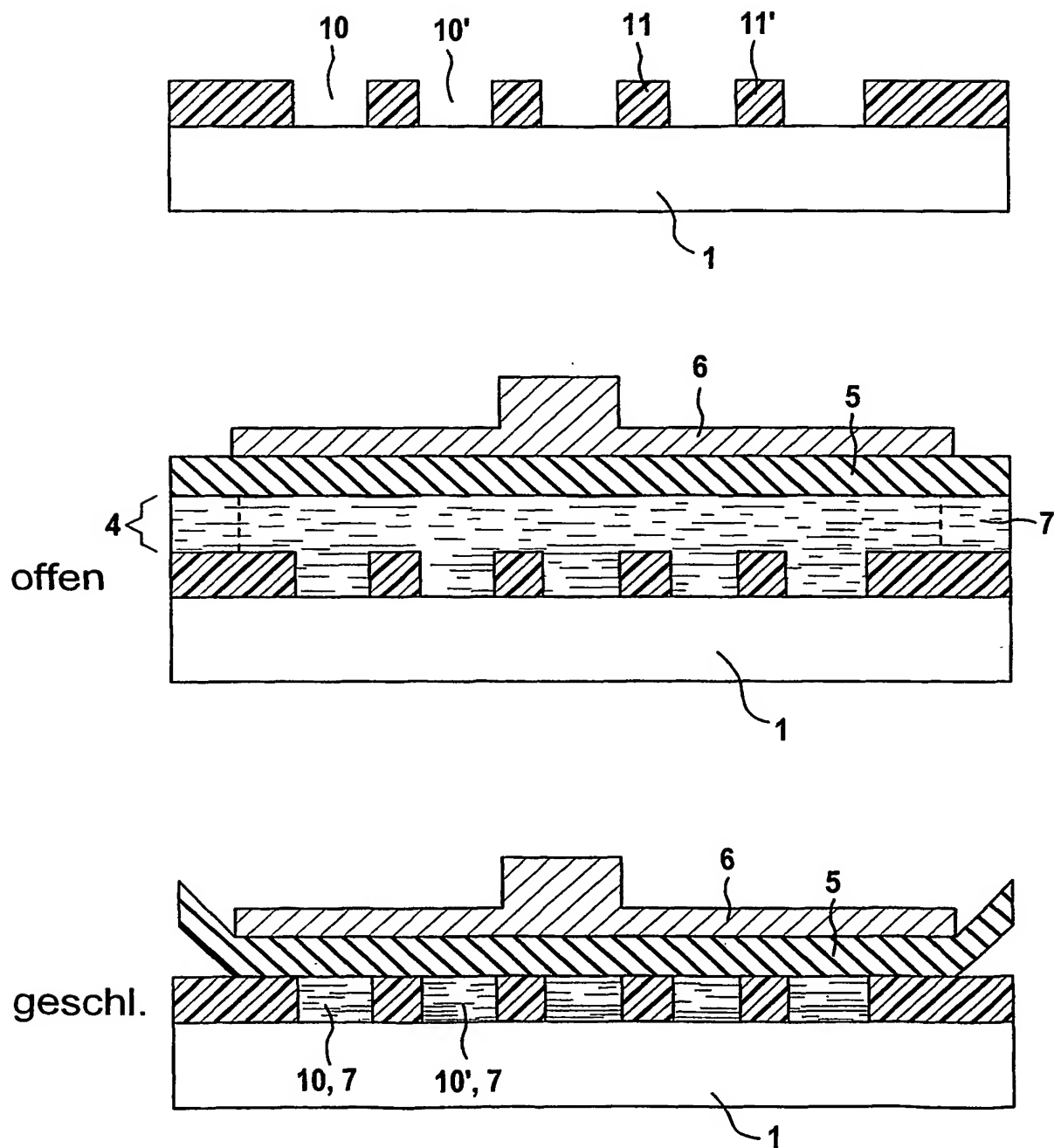


FIG 2

3/4

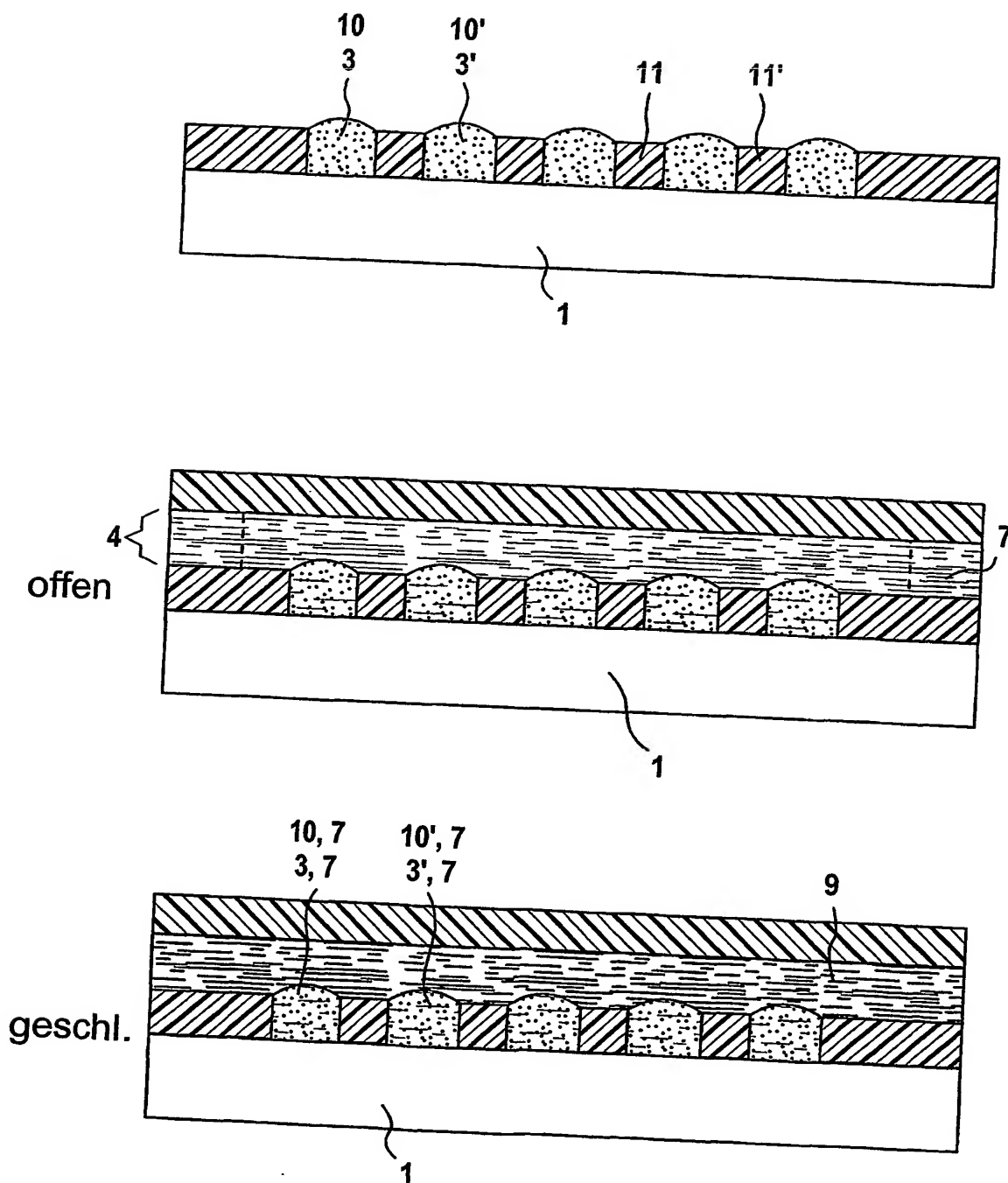


FIG 3

4/4

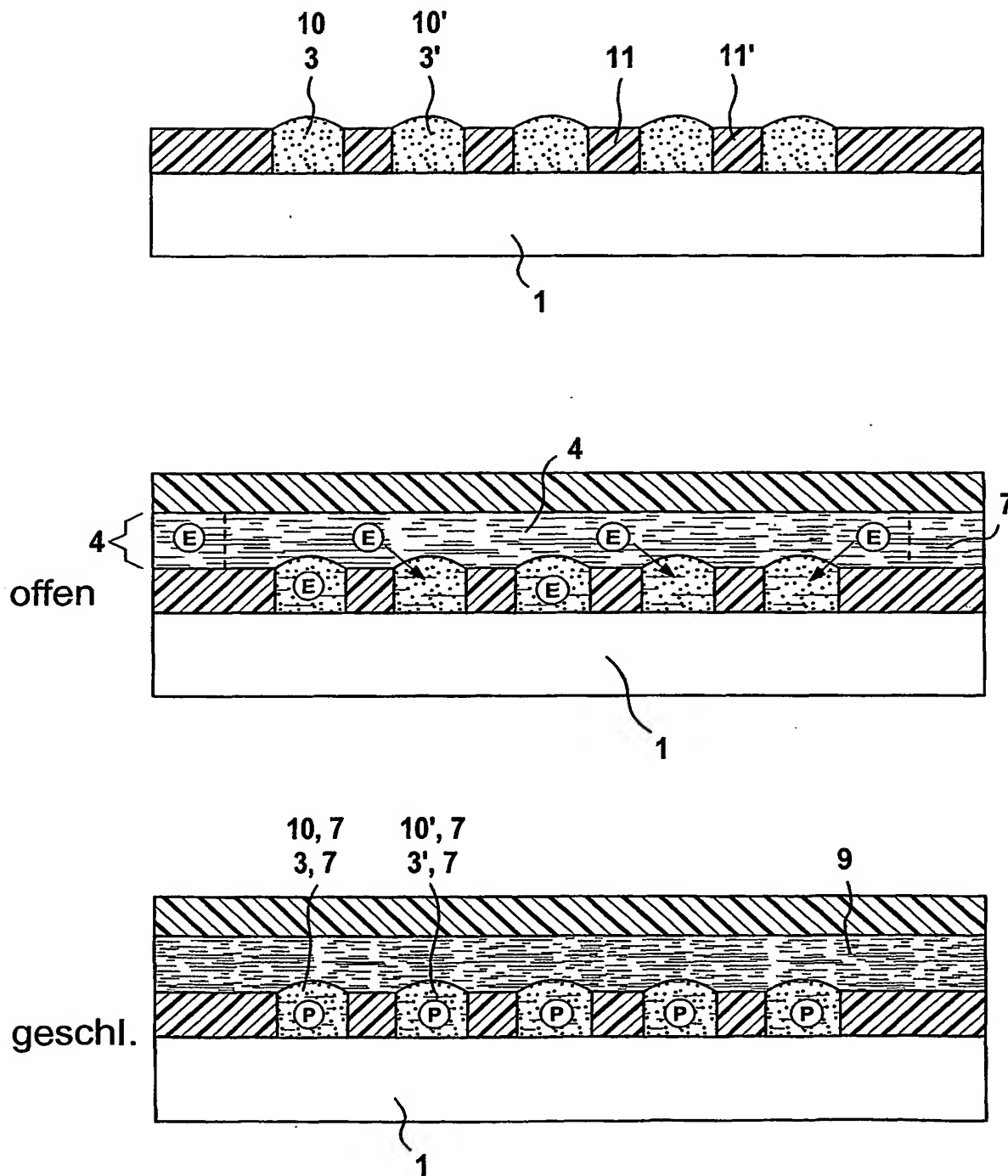


FIG 4

This Page Blank (uspto)